

微量血液吸着濾紙よりのトキソプラズマ 抗体の簡易検出法

小林昭夫† 渡辺直熙†
鈴木康弘† 平井徳幸§

(昭和53年7月21日 受領)

間接ラテックス凝集反応(LA)は、被検血清の非働化や吸収操作を要しないという長所を有するが、従来、トキソプラズマ(Tp)症の血清学的検査法として諸外国で試みられたLAは、いずれも反応の感度が低く、そのため実用の段階には到らなかった(Bozděch and Jira, 1961; Lunde and Jacobs, 1967; Kwantos *et al.*, 1972; Beverley *et al.*, 1973).

最近、坪田ら(1977 a, b)によって改良されたLAのマイクロタイター法は、我々(小林ら, 1977)の検討の結果では、反応の感度が高く、色素試験との定性的一致率も高くしめされたことから、これをTp感染症の診断法として十分応用しうるものと判断された。

しかし、本法をマス・スクリーニングの目的で多数の被検者に対して応用するためには、検査材料として、血清のみならず被検者から得られる微量の血液を濾紙に吸着、乾燥、保存しおいたものについても、これより容易に抗体を検出、定量しえられることが望ましく、とりわけこのことは血液採取にいちじるしい制約をとまなう新生児や幼児の場合においてそうである。

そこで我々は、微量の血液を吸着、乾燥させた濾紙小片からのTp抗体の検出、定量の可否、また可能であるとすれば、そのための条件について検討し若干の成績をえた。以下はその報告である。

材料および方法

1) 被検血清および血液

被検血清は非働化および吸収操作を施すことなく直接

本研究は文部省科学研究費(研究課題番号257121)の補助によって行なわれた。記して謝す。

† 東京慈恵会医科大学寄生虫学教室

§ 東京慈恵会医科大学中央検査部寄生虫科

LA反応に供した。血液吸着濾紙としては、フェニールケトン尿症(PKU)の検査において用いられるいわゆるPKU濾紙(北里研究所製)を使用した。吸着血液は、室温で乾燥後、各種の条件下に保存した。

LA反応にあたっては、血液吸着濾紙より直径3mmのディスクを打抜機によって切りとり、これを試験に供した。

2) 間接ラテックス凝集反応

LA反応は坪田ら(1977 a, b)の方法に準じて行ない、抗原感作ラテックス粒子および反作用緩衝液(0.2M aminomethylpropanol-HCl, pH 8.0)は栄研化学製品を用いた。反作用トレーとしてはディスポーザブルU字型(栄研器材)を用い、各穴に血清もしくは濾紙吸着血液の溶出液の各稀釈倍液25 μ lずつを入れ、これに抗原感作ラテックス浮遊液25 μ lずつを加えた。次いでトレーをマイクロミキサー(光和機材)を用いて数分間振盪後、室温にこれを1晩静置して凝集の有無を判読した。なお血清については、1:32以上の稀釈倍で凝集をしめしたものを陽性とした。

成績

1. 血液吸着濾紙からの血清溶出について

5人の正常人の血液をそれぞれPKU濾紙に滴下、吸着、乾燥後、直径3mm大のディスクを打抜いてとり、このディスクの1個、2個および3個をそれぞれ50 μ lの緩衝液中に浸し、マイクロミキサーで振盪し血清の溶出をおこなった。振盪、溶出時間は15、30、60、120分の各時間とした。溶出液についてはLowry(1951)法によってたん白濃度を測定した。

結果はFig. 1にしめされるように、溶出たん白濃度は15分間の振盪、溶出操作で既に最大に達し、使用ディスク

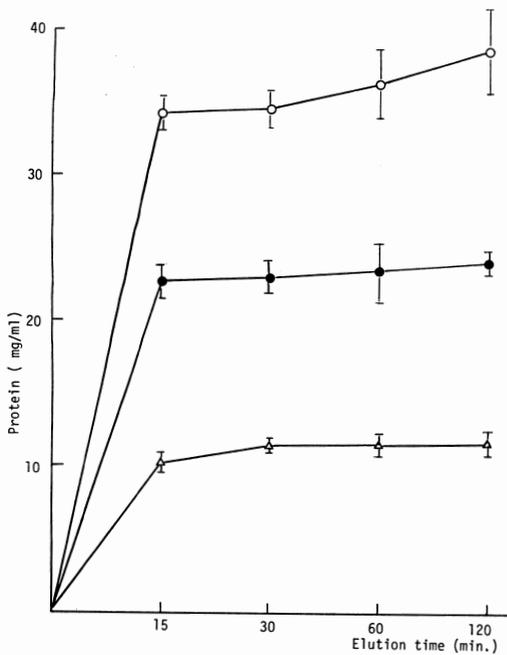


Fig. 1 Protein content in eluates from different pieces of blood-absorbed disc 3 pieces (○—○), 2 pieces (●—●) or 1 piece (△—△) of 3 mm diameter PKU-filter-paper disc absorbed with whole blood and ried were immersed in 50 μ l buffer solution and eluted using a micromixer. Eluates were measured by Lowry's method for protein concentration. Each plot represents average value on 5 different human blood samples.

の個数の増加に応じてたん白濃度も倍数的に増加をしめし、ディスク1個で10.2mg/ml, 同2個で22.7mg/ml, 同3個では34.2mg/mlであった。

2. 血清と血液吸着濾紙溶出液におけるLA抗体価の関係

LAによりTp抗体を有することが判明している13例の感染者につき、それぞれ血清と血液吸着PKU濾紙溶出液のLA抗体価を測定、比較した。すなわち血液吸着濾紙については、ディスク1個、2個または3個ずつを50 μ lの緩衝液に浸漬し30分間溶出、血清、溶出液とも2倍稀釈系列をつくりLA抗体価をもとめた。

その結果はTable 1にしめされるように、LA抗体価(log₂値)は用いたディスクの個数と比例してその増加をみた。すなわち血清による平均抗体価(log₂値)は8.69であったのに対してディスク1個使用時の溶出液のそれは3.76、ディスク2個では4.61、3個では5.46となつて

Table 1 Correlation between sera and blood-absorbed-paper-disc eluates with regard to LA antibody content

Test No.	Highest dilution (log ₂ value) producing agglutination by the use of			
	Serum	Eluate from blood-absorbed disc		
		1 piece	2 pieces	3 pieces
1	6	2	2	3
2	6	2	2	3
3	7	2	3	4
4	7	3	4	5
5	8	3	4	4
6	8	3	4	5
7	9	4	4	6
8	9	4	5	6
9	9	4	5	5
10	9	4	5	6
11	9	4	5	6
12	12	6	7	7
13	14	8	10	11
Aver.	8.69	3.76	4.61	5.46

おり、血清抗体価とディスク2個による溶出液の抗体価との差は4.08となつている。このことは、緩衝液50 μ l中ディスク2個による溶出液の抗体価を16倍して得られる値が、血清抗体価に相当するというを意味し、実際にはディスク2個と緩衝液50 μ lの組み合わせが最も適当であると考えられる。

そこで次に、上記血清とディスク2個による溶出液間の関係が実際に多数の症例について施行した場合においてもあてはまるか否かについて検討してみた。

Table 2はその結果をしめしたものであるが、このTableでは溶出液のLA抗体価は、先述の理由から、直接求めた値を16倍し修正した値としてしめしてある。

いまこのTableをみるに、溶出液、血清とも同一の抗体価をしめしたものは、29例中24例の多きに達し、また同一の抗体価がえられなかった他の5例についてもその差はわずか1管(2倍)にとどまつており、全体として両者よく一致することが証明された。

3. 血液吸着濾紙の保存とLA抗体価との関係

血液吸着濾紙の保存条件として、温度と期間につき検討した。LA抗体価既知の14例について、その血液をPKU濾紙に吸着してとり、これを2群に分け、各々低温(0~4C)および高温(27C)に保存した。保存

Table 2 Comparison of LA titers as determined by testing sera and PKU-filter-paper-absorbed blood

No.	Serum	Filter paper	No.	Serum	Filter paper
1	1:16	<1:16	16	1:128	1:128
2	1:16	1:16	17	1:128	1:128
3	1:32	1:32	18	1:256	1:128
4	1:32	1:32	19	1:256	1:256
5	1:32	1:32	20	1:256	1:256
6	1:32	1:32	21	1:256	1:256
7	1:32	1:32	22	1:256	1:256
8	1:32	1:32	23	1:256	1:256
9	1:32	1:32	24	1:256	1:256
10	1:32	1:32	25	1:512	1:256
11	1:32	1:32	26	1:512	1:512
12	1:64	1:64	27	1:512	1:512
13	1:64	1:128	28	1:2048	1:1024
14	1:128	1:128	29	1:8192	1:8192
15	1:128	1:128			

期間は、低温については120日まで、高温については60日までとし、その間一定期間ごとに各濾紙よりディスク2個ずつを打ち抜いてとり、これについて前述の方法によりLA反応を実施し抗体価をもとめた。

その結果は Table 3 にしめすごとく、低温、高温とも、

少くとも60日間の保存によつては実際上みるべきLA抗体価の変化がみとめられなかつた。

考 察

Tp 感染症のマス・スクリーニング、とりわけ新生児を対象とした場合にあつては、その血清反応としては、微量の血液から特異抗体を的確にかつ容易に検出するということが望ましい。とくに最近数種先天性代謝異常症のマス・スクリーニングが新生児血液吸着 PKU 濾紙を用いて行なわれつつある現状(北川, 1975)に鑑み、同上濾紙より Tp 抗体を検出するための条件について検討しておくことは意義のあることと思われる。

検討の結果は、先述のように、血液吸着濾紙から直径3mm 大のディスク2個を打ち抜き、これを50 μ lの緩衝液に溶出したものを血清16倍稀釈に相当するものとして、実際に血清とともにそれらのLA抗体価を求め、相互の比較をおこなつてみた結果は、両者よく一致することが判明した。

ディスク2個と緩衝液50 μ lの組み合わせが最も適当であると考えられたのは、濾紙溶出液と血清の抗体価の比が16倍という適当な数値であつたことがその主な理由であるが、ディスク3個を50 μ lに溶出させた場合は、溶出の程度にややバラツキが大きく、一方ディスク1個の場合は、その溶出液は血清の32倍稀釈に相当することになる

Table 3 Effects of storage of blood-absorbed-PKU-filter paper on LA titer

Storage temper.	Sample No.	LA titer after stored for days of . . .					
		0	15	30	60	90	120
0-4C	1	1:32	1:32	1:32	1:16	1:16	1:16
	2	1:32	1:32	1:32	1:16	1:16	1:16
	3	1:32	1:32	1:32	1:32	1:16	ND*
	4	1:32	1:32	1:32	1:32	1:32	1:32
	5	1:32	1:32	1:32	1:32	1:32	1:32
	6	1:128	1:128	1:128	1:128	1:128	1:128
	7	1:512	1:512	1:256	1:512	1:512	1:512
27C	8	1:32	1:32	1:32	1:32	ND*	ND
	9	1:32	1:32	1:32	1:64	ND	ND
	10	1:128	1:128	1:128	1:128	ND	ND
	11	1:256	1:256	1:256	1:256	ND	ND
	12	1:256	1:256	1:512	1:256	ND	ND
	13	1:256	1:256	1:256	1:512	ND	ND
	14	1:512	1:256	1:256	1:512	ND	ND

* Not done

ので、血清 LA 抗体価が 1:16 以下のものについては抗体の検出もれが起りうるという難点があるからでもある。

血液吸着濾紙を 27C というやや高い温度条件下に保存した場合でさえ、少くとも 2 ヶ月間の保存によつて、事実上全く抗体価の減弱をきたさなかつたことは、血液吸着濾紙と LA の組み合わせによる検査術式は、マス・スクリーニングの目的によく適うものであると考えることができる。

我々は以上の方法を用い、実際に先天性代謝異常の検査に用いられる血液吸着 PKU 濾紙を利用して Tp 感染症のマス・スクリーニングを実施し、十分その有用性をみとめているが、これについては別の機会に譲る。

要 約

トキソプラズマ感染症のマス・スクリーニングに応用する目的で、血液吸着 PKU 濾紙からの溶出液を用いた間接ラテックス凝集反応 (LA) について検討し、以下の結果をえた。

1. 血液吸着 PKU 濾紙から直径 3 mm 大のディスク 2 個を打ち抜いてとり、これを緩衝液 50 μ l 中、30 分間振盪してえられる溶出液は LA 抗体価による比較から血清 16 倍希釈に相当することが判明した。

2. 各種 LA 抗体価を有する 29 例につき、それぞれ血清および血液吸着濾紙溶出液についての LA 抗体価をもとめ (後者については修正値) 比較したところ、両者よく一致をみた。

3. 血液吸着 PKU 濾紙を 0~4 C および 27C に保存した場合、いずれの温度下でも少なくとも 2 ヶ月の保存では LA 抗体価にみるべき影響を及ぼさなかつた。

以上により、血液吸着 PKU 濾紙を用いた LA 反応は Tp 感染症のマス・スクリーニングに十分応用しうるものと結論された。

終りにのぞみ、有益な御教示を賜わつた日本大学医学部小児科北川照男教授に深謝する。また種々技術的援助

をいただいた本学寄生虫学教室内田雅子、本田元子、阿井美幸の諸君に感謝する。

文 献

- 1) Beverley, J. K. A., Freeman, A. P. and Watson, W. A. (1973): Comparison of a commercial toxoplasmosis latex slide agglutination test with the dye test. *Vet. Rec.*, 93, 216-218.
- 2) Bozděch, V. and Jira, J. (1961): Latex-agglutinations test mit dem Toxoplasma antigen. *Deut. Gesundh.*, 16, 2398-2400.
- 3) 北川照男 (1975): 新生児における先天性代謝異常症の診断とマス・スクリーニング. *新生児誌*, 11, 233-242.
- 4) 小林昭夫・平井徳幸・鈴木康弘・西川洋昭・渡辺直照 (1977): トキソプラズマラテックス凝集反応 (トキシテスト-MT) の検討. *寄生虫誌*, 26, 175-180.
- 5) Kwantos, W., Payne, R. A., Ludlam, G. B., Bridges, J. B. and Fleck, D. G. (1972): An assessment of a latex agglutination slide test for toxoplasma antibody. *J. Clin. Path.*, 25, 359-360.
- 6) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951): Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 256-275.
- 7) Lunde, M. N. and Jacobs, L. (1967): Evaluation of a latex agglutination test for toxoplasmosis. *J. Parasit.*, 53, 933-936.
- 8) 坪田宣之・小沢 光 (1977 a): トキソプラズマラテックス凝集反応に関する研究 (第 1 報) マイクロタイター用試薬の調製条件と安定性. *寄生虫誌*, 26, 276-285.
- 9) 坪田宣之・平岡謙一・沢田良信・渡辺俊子・大島 慧 (1977 b): トキソプラズマラテックス凝集反応に関する研究 (第 2 報) マイクロタイター用試薬によるヒトの診断法. *寄生虫誌*, 26, 286-290.

Abstract

A SIMPLE MASS-SCREENING METHOD FOR TOXOPLASMOSIS—DETECTION
OF THE ANTIBODIES FROM BLOOD-ABSORBED-FILTER-PAPER DISCS
USING THE INDIRECT LATEX AGGLUTINATION TEST

AKIO KOBAYASHI, NAOHIRO WATANABE, YASUHIRO SUZUKI
AND NORIYUKI HIRAI

*(Department of Parasitology, The Jikei University School of Medicine, and Clinical
Laboratory, The Jikei University School of Medicine, Tokyo, Japan)*

The indirect latex agglutination (LA) test (Toxotest-MT, Eiken Co.) was studied for possible application to the mass-screening of toxoplasmosis, using small discs of the blood-absorbed PKU filter paper. Results obtained are as follows ;

1. The elution of two pieces of the discs of 3 mm diameter in 50 μ l buffer (0.2 M amino-methylpropanol-HCl, pH 8.0) for 30 min. using a micromixer was satisfying. The eluate thus obtained was proved to be equivalent to 1 : 16 dilution of the serum in regard to the antibody titer.

2. The LA test titers of serum and eluate were essentially the same on 29 cases tested when values of disc eluate were adjusted.

3. The PKU filter-paper absorbed blood could be stored at either 0-4C or 27C for at least 2 months without altering the antibody titer.

It was concluded that the LA test using PKU-filter paper discs absorbed with the blood well can be used as a useful tool for the mass-screening of toxoplasmosis.